

# 熊果酸通过促进自噬保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9C2 大鼠心肌细胞氧化应激损伤

王绮雯<sup>1</sup>, 陈志健<sup>1</sup>, 张旺发<sup>1</sup>, 王浩<sup>1</sup>, 李爱群<sup>2</sup> (1. 广州医科大学附属第二医院, 广东 广州 510260; 2. 广州南方学院云康医学与健康学院, 广东 广州 510970)

**摘要:** **目的** 研究熊果酸(Ursoic acid, UA)对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的 H9C2 大鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用及对细胞自噬的调节作用。**方法** 以 200 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 24 h 建立 H9C2 心肌细胞氧化应激损伤模型。将 H9C2 细胞随机分为 6 组: 正常组、溶剂组、模型组及熊果酸高、中、低剂量(10、5、2.5 μmol·L<sup>-1</sup>)组。采用 CCK-8 法检测细胞存活率; EdU 法检测细胞增殖能力; TBA 法检测丙二醛(MDA)脂质氧化水平; WST-8 法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性; Western Blot 法检测自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ/I 比值及 p62 的表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组细胞的存活率及 EdU 阳性细胞(红色荧光)百分比均明显降低( $P<0.05$ ); 细胞内 MDA 脂质氧化水平明显升高( $P<0.05$ ), SOD 活性明显降低( $P<0.05$ ); LC3-Ⅱ/I 蛋白表达比值明显上调( $P<0.05$ ), p62 蛋白表达明显下调( $P<0.05$ )。与模型组比较, 熊果酸高、中、低剂量均能明显提高 H9C2 的细胞存活率及 EdU 阳性细胞百分比( $P<0.05$ ); 降低 MDA 水平( $P<0.05$ ), 提高 SOD 活性( $P<0.05$ ); 上调 LC3-Ⅱ/I 蛋白表达比值( $P<0.05$ ), 下调 p62 蛋白表达水平( $P<0.05$ )。**结论** 熊果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9C2 大鼠心肌细胞氧化应激损伤具有明显保护作用, 可能与其促进细胞自噬有关。

**关键词:** 熊果酸; H9C2 细胞; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 氧化应激; 细胞自噬; LC3-Ⅱ/I; p62

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)11-1615-07

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.11.004

## Ursolic Acid Protects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Myocardial Oxidative Stress by Promoting Autophagy

WANG Qiwen<sup>1</sup>, CHEN Zhijian<sup>1</sup>, ZHANG Wangfa<sup>1</sup>, WANG Hao<sup>1</sup>, LI Aiqun<sup>2</sup> (1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260 Guangdong, China; 2. Yunkang School of Medicine and Health, Nanfang College, Guangzhou 510970 Guangdong, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the antioxidant effect of Ursolic acid (UA) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced myocardial oxidative stress injury and the regulation of autophagy. **Methods** The H9C2 cells were *in vitro* cultured with 200 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hours to establish H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced myocardial oxidative stress model. The cells were divided into normal group, solvent group, model group, and high-, medium- and low-dose UA groups (10, 5 and 2.5 μmol·L<sup>-1</sup> UA, respectively). The cell survival rate was detected by CCK-8 method, the cell proliferation activity was detected by EdU, lipid oxidation level was presented using content of malondialdehyde(MDA) and was detected by TBA method. The activity of superoxide dismutase(SOD) was detected by WST-8, and the autophagy related proteins of LC3-Ⅱ/I and p62 were detected by Western Blot. **Results** Compared with the normal group, the cell survival rate, and the percentage of EdU positive cells(with red florescence) decreased( $P<0.05$ ) in the model group; the level of MDA significantly increased( $P<0.05$ ), the activity of SOD decreased obviously( $P<0.05$ ); the expression ratio of LC3-Ⅱ/I increased( $P<0.05$ ) and p62 expression decreased( $P<0.05$ ). Compared

收稿日期: 2021-06-15

作者简介: 王绮雯, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中医药防治心肌缺血。Email: evanswang@sina.com。通信作者: 李爱群, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中医药防治心肌缺血。Email: ykgliaiqun@163.com。

基金项目: 广东省中医药局科研项目(20201214); 广东省医学科研基金项目(A2019061); 广东省普通高校青年创新人才项目(2020KQNCX128)。

with the model group, The high-, medium- and low-dose of UA could increase the cell survival rates and the percentages of EdU positive cells, decrease the levels of MDA ( $P < 0.05$ ), increase the activities of SOD ( $P < 0.05$ ), increase the expression ratio of LC3- II / I ( $P < 0.05$ ), downregulate the expression levels of p62 ( $P < 0.05$ ) of cells. **Conclusion** UA can improve the viability and proliferation ability of H9C2 cells injured by  $H_2O_2$  induced by oxidative stress. It can decrease the level of MDA, increase the activity of SOD, promote cell autophagy, and improve the damage of oxidative stress.

**Keywords:** Ursolic acid; H9C2 cells;  $H_2O_2$ ; oxidative stress; autophagy; LC3- II / I ; p62

缺血性心肌病(Ischemic cardiomyopathy, ICM)是由于长期心肌缺血导致心肌弥漫性纤维化,从而引起心功能受损,以心脏扩大、心律失常、心力衰竭为特征<sup>[1]</sup>,是冠心病的晚期阶段<sup>[2]</sup>,其发病率逐年升高。一项最新的世界卫生组织(WHO)调查<sup>[3]</sup>显示,缺血性心肌病是心血管疾病死亡的主要原因,严重危害人类健康。

细胞自噬普遍存在于细胞分解、代谢过程,通过吞噬降解自体胞质蛋白、细胞器,满足自身代谢需要与细胞器更新<sup>[4]</sup>。自噬循环利用细胞成分和受损的细胞器以应对不同的应激条件,如氧化应激、病毒感染等。氧化应激是一种细胞和(或)体内产生过多的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),超过自身抗氧化防御能力,导致蛋白质、脂质和 DNA 损伤的状态<sup>[5]</sup>。自噬和氧化应激之间存在复杂的相互作用关系,氧化应激产生的活性氧能诱导自噬发生,然而自噬激活又可以通过清除受损的线粒体,降低活性氧水平,减轻细胞氧化应激损伤,调节细胞氧化应激水平,所以活性氧可以诱导自噬,而自噬又可以调节氧化应激<sup>[6]</sup>。自噬和氧化应激在缺血性心肌病的发生发展中均有出现,但两者间的相互作用机制尚不十分清楚。

熊果酸(Ursoic acid, UA)又称乌索酸,是一种存在于枇杷叶、熊果果实等植物部位中的五环三萜类化合物<sup>[7]</sup>。研究发现,熊果酸具有抗氧化自由基<sup>[8]</sup>、抗氧化应激<sup>[9]</sup>、促进自噬<sup>[10]</sup>、抗肿瘤<sup>[11]</sup>、降血脂<sup>[12]</sup>等多种药理作用。前期研究<sup>[13]</sup>表明,熊果酸能降低氧化应激损伤心肌细胞的乳酸脱氢酶(LDH)及活性氧水平,提高超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性,提示熊果酸对心肌细胞有抗氧化应激作用。本研究拟利用过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导氧化应激体外模型,观察熊果酸对损伤的心肌细胞活力和增殖的影响,并检测氧化应激相关指标及自噬相关蛋白的表达情况,探讨熊果酸通过调控自噬和抗氧化应激保护缺

血性心肌损伤的机制,以期对心血管疾病治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞** H9C2 大鼠心肌细胞,由广州市心血管疾病研究所馈赠。

**1.2 主要试剂** 熊果酸(批号: U6753)、 $H_2O_2$ (批号: 88597),美国 Sigma 公司;熊果酸用二甲基亚砜(DMSO)溶解制备  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  母液,再以 DMEM 稀释至工作浓度。FBS(批号: 42Q3180K)、DMEM(批号: 8118189),美国 Gibco 公司; CCK-8(批号: KV560),东仁化学科技(上海)有限公司; EdU 细胞增殖检测试剂盒(批号: C0078S)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(批号: S0131S)和 SOD 检测试剂盒(批号: S0101S),上海碧云天生物技术公司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号: 20190222),美国 Thermo 科技公司; RIPA 裂解液(批号: 2333S),北京康为世纪有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号: PG112),上海雅酶生物技术有限公司; 超敏 ECL 发光液(批号: 1723301),美国 Millipore 公司; 彩色预染蛋白 Marker(批号: BL712A),合肥白鲨(Biosharp)生物科技公司; LC3-I/II 抗体(批号: #12741)、p62 抗体(批号: #39749)、 $\beta$ -actin 抗体(批号: #4970),美国 CST 公司; HRP-山羊抗兔二抗(批号: BM3894),武汉博士德生物工程有限公司。

**1.3 主要仪器** Heraeus 150i 型  $CO_2$  恒温细胞培养箱,美国 Thermo 科技公司; CK40-32PH 型倒置显微镜,日本 Olympus 公司; DMIL LED 型荧光倒置显微镜,德国 Leica 公司; iMark 型酶标仪、mini Trans-Biot Cell 蛋白电泳系统,美国 Bio-Rad 公司; Chemiscope 6300 型荧光化学发光成像系统,中国勤翔公司。

**1.4 CCK-8 法检测细胞存活率** 将 H9C2 细胞接种于 96 孔培养板中,每孔加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  含  $2\times 10^3$  个细胞

的 DMEM 完全培养基, 外周孔中加入 200  $\mu\text{L}$  无菌 PBS。在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h 后, 分别加入用完全培养基稀释的熊果酸溶液, 使其最终浓度为 200、100、80、50、40、20、10、5、2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 同一浓度设 6 个复孔, 正常组加入不含药物的完全培养基。继续培养 24 h 后, 加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  下继续孵育 1 h 后, 在 450 nm 波长条件下检测各孔光密度(OD)值, 并根据结果确定熊果酸高、中、低剂量浓度。计算: 细胞存活率(%)=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(正常组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

**1.5 细胞分组及干预** 通过预实验确定造模条件: 采用 CCK-8 法检测 100~600  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 24 h 后 H9C2 细胞的存活率。结果与正常组比较, 各组细胞存活率均明显降低 ( $P<0.05$ ), 其中 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组的细胞存活率为 52%, 高于其他组, 故确定氧化应激损伤模型的建立条件为 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 24 h。

将 H9C2 细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔  $2\times 10^3$  个细胞, 随机分为 6 组: 正常组、溶剂组、模型组及熊果酸高、中、低剂量组, 每组 10 个复孔。正常组用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基培养; 溶剂组用含 1% (V/V) DMSO 的完全培养基培养 (DMSO 含量与熊果酸剂量组相同); 模型组用 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 24 h; 熊果酸高、中、低剂量组 (10、5、2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , DMSO 含量为 1%) 以药物预处理 24 h, 更换培养液后, 再加入 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 24 h。然后, 采用 CCK-8 法检测各组细胞存活率, 方法同“1.4”项下。

**1.6 EdU 法检测 H9C2 细胞增殖情况** 将各组细胞接种于 24 孔板中, 同“1.5”下干预处理后, 根据 EdU 试剂盒说明书步骤操作。各组细胞加入 EdU (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 2 h; 以 4% 多聚甲醛固定 30 min, 洗涤 3 次; 加入 0.3% Triton $\times 100$  孵育 15 min, 洗涤 3 次; 加入配制好的 Click 反应液 100  $\mu\text{L}$ , 避光孵育 30 min, 洗涤 3 次; 最后, 以 Hoechst 染核 3 min。采用荧光显微镜拍照 (每组 5 个视野), 并用 ImageJ 软件计数, 计算: EdU 阳性细胞百分比(%)=新增殖细胞数 (红色荧光)/细胞核数 (蓝色荧光) $\times 100\%$ 。

**1.7 细胞中 MDA 含量及 SOD 活性检测** 将各组细胞接种于 6 孔板中, 同“1.5”下干预处理后, 弃去培养基; PBS 洗涤 3 次后, 用细胞刮刮下细胞, 置于 EP 管中, 以 180 $\times g$  离心 10 min, 弃去上清; 加入 200  $\mu\text{L}$  预冷的 PBS, 吹打细胞, 在冰水浴条件下超

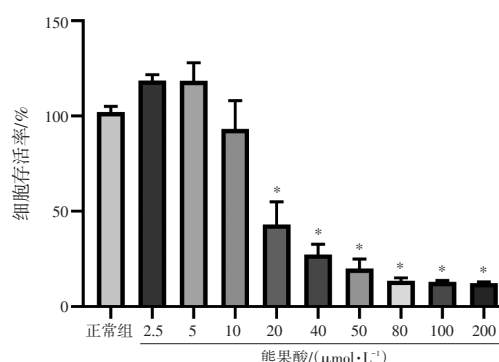
声破碎细胞; 4  $^{\circ}\text{C}$  下以 13 680 $\times g$  离心 5 min, 取上清; 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后, 根据试剂盒说明书步骤操作, 以 TBA 法检测 MDA 含量, WST-8 法检测 SOD 活性。

**1.8 Western Blot 法检测 H9C2 细胞中 LC3-II/I、p62 蛋白的表达** 各组细胞接种于 6 孔板中, 同“1.5”下干预处理后, 加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞; 提取总蛋白, 并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 等量上样 (30  $\mu\text{g}$  蛋白)。经 SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜, 以 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 加入一抗 LC3 (1:1 000)、p62 (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:1 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜; 洗膜后, 加入 HRP-山羊抗兔二抗 (1:10 000), 室温下孵育 2 h; 洗膜后, 采用 ECL 化学发光显色。采用化学发光成像系统进行拍照, 以  $\beta$ -actin 为内参, 采用 ImageJ 软件对目的蛋白进行半定量分析。

**1.9 统计学处理方法** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 熊果酸对 H9C2 细胞存活率的影响** 结果见图 1。与正常组比较, 浓度范围在 20~200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的熊果酸作用 24 h 后, 细胞存活率明显降低, 且呈浓度依赖关系, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。浓度范围在 2.5~10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的熊果酸作用 24 h 后, 细胞存活率略高于正常组, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。结果表明, 熊果酸在 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度以上对 H9C2 细胞生长有抑制作用, 因此确定熊果酸的高、中、低



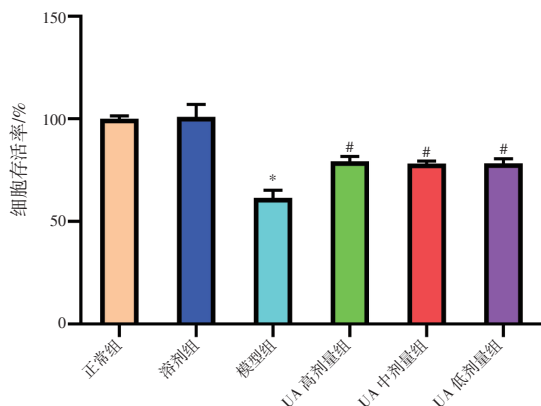
注: 与正常组比较, \* $P<0.05$

图 1 熊果酸对 H9C2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Figure 1 Effect of ursolic acid on survival rate of H9C2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

剂量浓度为 10、5、2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.2 熊果酸对  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞存活率的影响** 结果见图 2。与溶剂组比较, 正常组的细胞存活率无明显变化, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组比较, 模型组的细胞存活率明显降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组比较, 熊果酸高、中、低剂量组的细胞存活率均明显升高, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结果表明, 熊果酸可保护  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导损伤的 H9C2 细胞, 提高细胞存活率。



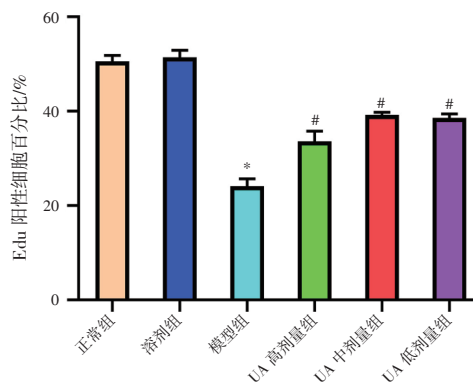
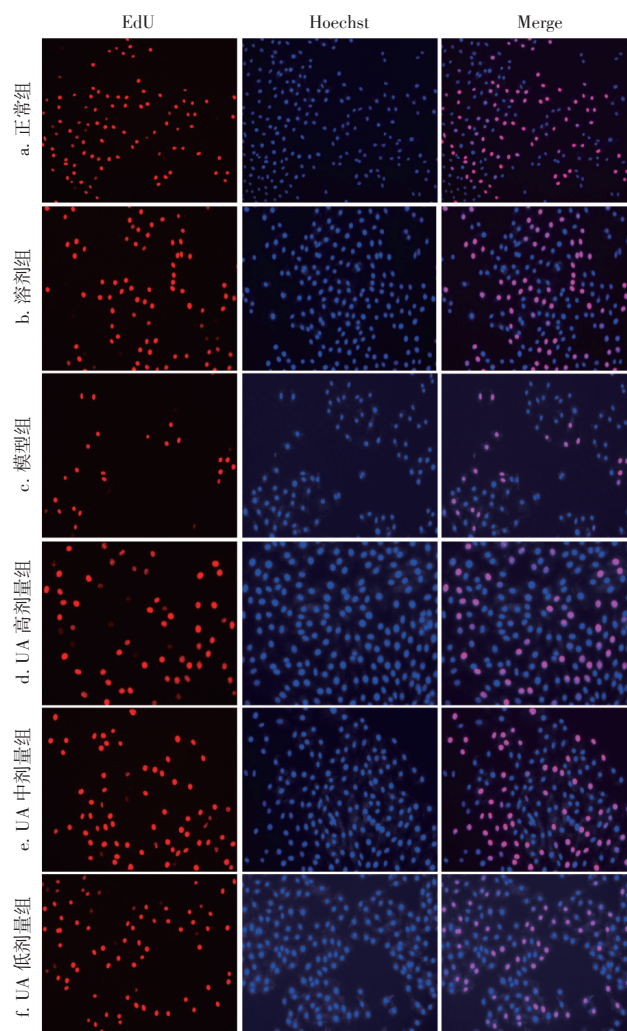
注: 与正常组比较, \* $P<0.05$ ; 与模型组比较, # $P<0.05$

图 2 熊果酸(UA)对  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Figure 2 Effect of ursoic acid on survival rate of H9C2 cells injured by  $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**2.3 熊果酸对  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞增殖的影响** 结果见图 3。与溶剂组比较, 正常组的 EdU 阳性细胞(红色荧光)百分比无明显变化, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组比较, 模型组的 EdU 阳性细胞百分比明显降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组比较, 熊果酸高、中、低剂量组的 EdU 阳性细胞百分比明显升高, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结果表明, 熊果酸能提高  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞的增殖能力。

**2.4 熊果酸对  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞 MDA 含量及 SOD 活性的影响** 结果见图 4。与溶剂组比较, 正常组细胞的 MDA 水平、SOD 活性无明显变化, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组比较, 模型组细胞的 MDA 水平明显升高( $P<0.05$ ), SOD 活性明显降低( $P<0.05$ )。与模型组比较, 熊果酸高、中、低剂量组细胞的 MDA 水平明显降低( $P<0.05$ ), SOD 活性明显升高( $P<0.05$ )。结果表明, 熊果酸能提高  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞的抗氧化应激能力, 降低脂质氧化水平, 增强抗氧化酶的活性。

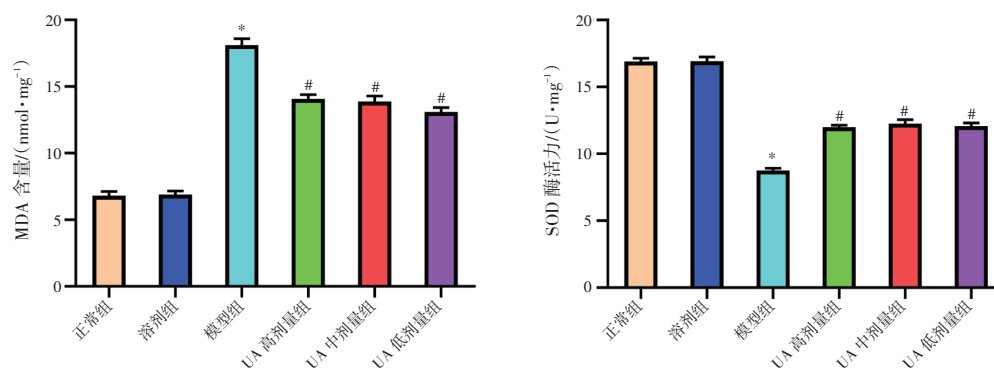


注: 与正常组比较, \* $P<0.05$ ; 与模型组比较, # $P<0.05$

图 3 熊果酸(UA)对  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞增殖的影响(EdU 染色,  $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Figure 3 Effect of ursoic acid on cell proliferation of H9C2 cells injured by  $\text{H}_2\text{O}_2$ (EdU staining,  $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

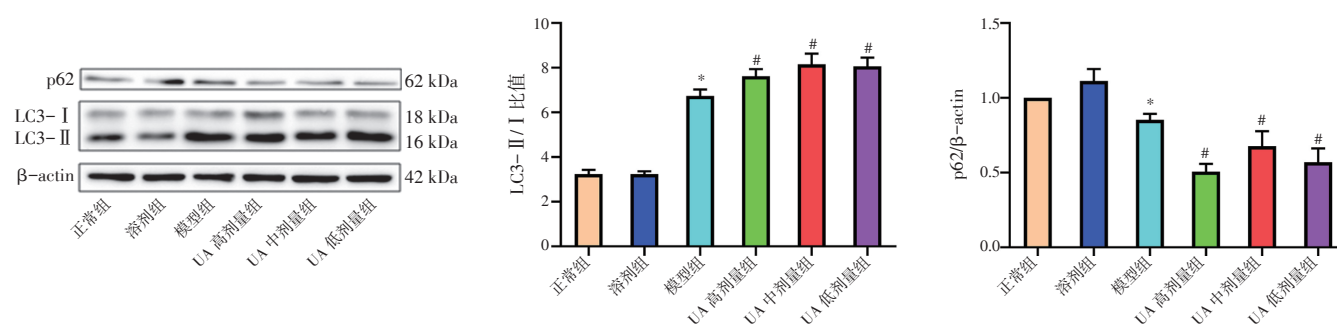
**2.5 熊果酸对  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤的 H9C2 细胞 LC3-II/I、p62 蛋白表达的影响** 结果见图 5。与溶剂组比较, 正常组细胞的 LC3-II/I 比值、p62 蛋白表达无明显变化, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组比较, 模型组细胞的 LC3-II/I 比值明显升



注：与正常组比较，\* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图 4 熊果酸(UA)对  $H_2O_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Figure 4 Effect of ursoic acid on the content of MDA, activity of SOD of H9C2 cells injured by  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )



注：与正常组比较，\* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图 5 熊果酸(UA)对  $H_2O_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞 LC3-II/I、p62 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 5 Effect of ursoic acid on the protein expression levels of LC3-II/I, p62 in H9C2 cells injured by  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

高( $P < 0.05$ )，p62 蛋白表达明显下调( $P < 0.05$ )。与模型组比较，熊果酸高、中、低剂量组细胞的 LC3-II/I 比值明显升高( $P < 0.05$ )，p62 蛋白表达明显下调( $P < 0.05$ )。结果表明，熊果酸能提高  $H_2O_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞的自噬能力。

### 3 讨论

缺血性心肌病是在缺血缺氧条件下，由于心肌形态和功能改变引起的心功能不全，其发生、发展过程均可见细胞自噬和氧化应激现象<sup>[14]</sup>，提示调控自噬和抗氧化应激可能成为治疗缺血性心肌病的关键靶点。研究<sup>[15-16]</sup>发现，多种中药有效成分可通过调控自噬和抗氧化应激保护缺血性心肌。熊果酸存在于多种中药材中，具有广泛的生物活性，是一种天然的抗氧化剂<sup>[8-10]</sup>，可能通过调控自噬和抗氧化应激保护缺血性心肌。

多种心血管疾病被证明与活性氧的过量产生有关<sup>[17-18]</sup>。维持细胞或机体功能的正常运作，保持活性氧和抗氧化剂之间(氧化/抗氧化)的平衡十分重要。基础浓度的活性氧对于细胞功能的发挥是不可或缺

的，但过高浓度的活性氧会引发氧化应激反应，导致细胞坏死与凋亡。缺血性心肌病发生过程中心脏氧化应激增加，打破了两者的平衡状态，造成活性氧积累，抗氧化防御能力降低，从而导致心肌受损。 $H_2O_2$  是一种重要的活性氧，可导致细胞内的蛋白、核酸及脂类代谢物产生不同形式的氧化改变，触发细胞死亡<sup>[19]</sup>。MDA 是一种生物体脂质氧化的天然产物，氧化应激发生时，一些脂肪酸发生脂质氧化后生成 MDA，造成细胞损伤，因此 MDA 水平可反映脂质氧化的水平，同时也是氧化应激(即脂质过氧化)最常见的生物标志物<sup>[20]</sup>。SOD 是抗氧化剂的第一酶系，是体内清除活性氧的重要抗氧化酶<sup>[21]</sup>。SOD 与 MDA 呈负相关，两者都是反映自由基水平和氧化应激程度的常用检测指标。本研究利用  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  诱导 H9C2 细胞 24 h 后，可使细胞 MDA 含量明显增加，SOD 活性急剧下降。而熊果酸预处理后，能有效促进  $H_2O_2$  氧化应激损伤 H9C2 细胞的生长(存活率)和增殖(EdU 阳性细胞百分比)，抑制氧化应激造成的 MDA 含量升高，增强 SOD 活性。提示熊果酸能提高心肌细胞的抗氧化能

力,降低其氧化应激水平,从而起到保护缺血性心肌的作用。

自噬是一种保守的自我降解系统,在应激条件下对于维持细胞内稳态起到至关重要的作用<sup>[22]</sup>。自噬功能失调对健康和疾病都有严重影响。自噬在心脏疾病中的作用取决于特定的病理情况和发病阶段,适度的自噬对心脏健康至关重要,而自噬不足或过度都是有害的<sup>[23]</sup>。Fu等<sup>[24]</sup>研究表明,天麻素预处理可通过增加自噬通量(p62蛋白表达水平下降、LC3 II蛋白表达水平升高)减轻小鼠心肌缺血/再灌注损伤,其机制与p-AMPK升高及p-mTOR降低有关。Zhong等<sup>[25]</sup>研究发现,曲美他嗪能提高缺血/再灌注损伤心肌细胞的LC3- II/I比值和自噬通量(p62降解,自噬小体和自溶酶体增加),促进自噬同时还能减少细胞凋亡,提高细胞存活率。Ling等<sup>[26]</sup>研究发现,虎杖苷能通过促进自噬通量清除受损的线粒体,减少活性氧和细胞死亡,从而抑制心肌缺氧/复氧损伤。然而,也有研究出现与上述研究不同的结果。Zeng等<sup>[27]</sup>发现,在心肌缺血/再灌注阶段,西红花苷干预后可明显减少心肌细胞凋亡,电镜下心肌细胞自噬小体的数量明显减少,其机制与激活AKT/mTOR信号通路降低自噬有关。Yang等<sup>[28]</sup>研究发现,黄芪甲苷IV可通过抑制细胞凋亡,下调自噬相关蛋白LC3- II、Beclin-1,上调Bcl-2、GATA-4改善缺氧/复氧诱导的H9C2细胞损伤。因此,在特定的病理状态或发病阶段,不同药物可能通过不同机制促进自噬或降低自噬来保护氧化应激损伤的心肌细胞。

自噬是一个复杂的动态过程,准确可靠地检测自噬活性尤为重要,免疫印迹(Western Blot)分析LC3和p62等蛋白已被广泛用于监测自噬通量(整体自噬降解,即向溶酶体运送自噬货物)。LC3有LC3- I和LC3- II两种形式,在凝胶电泳上,LC3- II比LC3- I迁移得更快,LC3- II/I的比值可反映在任何特定时间形成的自噬小体数量<sup>[22]</sup>。p62作为降解自噬溶酶体的关键蛋白,其表达水平与自噬水平呈反比关系,随着自噬作用的增强而不断被消耗<sup>[29]</sup>。单纯LC3- II的表达不能反映自噬通量<sup>[30]</sup>,而p62则参与了这一过程,因此自噬通量的研究需要同时检测p62和LC3- II。Jiang等<sup>[31]</sup>研究发现,熊果酸可减轻低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激损伤,其机制与增加SIRT1表达,减少赖氨酸残基ATG5乙酰化和增加自噬有关。本研究结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>单独处理H9C2细胞后,LC3- II/I比值明显提高,p62

蛋白表达明显下调,提示氧化应激诱导了自噬发生。而熊果酸预处理后,与模型组比较,LC3- II/I比值明显升高,p62蛋白表达明显进一步下调,表明熊果酸增强了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化应激损伤H9C2细胞的自噬水平。

综上所述,自噬和氧化应激之间存在复杂的相互作用关系,氧化应激产生的活性氧能诱导自噬产生,而自噬激活又可以通过清除受损的线粒体,降低活性氧,减轻细胞氧化应激损伤,调节细胞氧化应激水平<sup>[6]</sup>。在一定程度上,适当的自噬可视为机体自我修复、自我保护机制之一。本研究结果显示,熊果酸能提高H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的H9C2细胞氧化应激损伤模型的细胞活力和增殖能力,降低MDA水平,提高SOD活性,具有明显抑制氧化应激损伤的作用,可能与其促进细胞自噬有关。

#### 参考文献:

- [1] 高士超. 缺血性心脏病患者血浆BNP水平测定与LVEF值预后的相关性[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.
- [2] 陈思, 陈光辉. miR-214在心血管疾病中的作用综述[J]. 解放军医学院学报, 2021, 41(12): 1270-1273.
- [3] DUNLAY S M, ROGER V L, REDFIELD M M. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction[J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(10): 591-602.
- [4] ABDELLATIF M, SEDEJ S, CARMONA-GURIERREZ D, et al. Autophagy in cardiovascular aging[J]. Circulation Research, 2018, 123(7): 803-824.
- [5] 林李嘉慧, 王建平. 钠-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂与糖尿病大血管病变氧化应激的关系研究进展[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(1): 98-102.
- [6] REDZA-DUTORDOIR M, AVERILL-BATES D A. Interactions between reactive oxygen species and autophagy: special issue: death mechanisms in cellular homeostasis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2021, 1868(8): e119041.
- [7] 王敏, 布仁, 陈建平, 等. 蒙药乌兰三味汤散质量标准的研究[J]. 中成药, 2019, 41(4): 892-8951.
- [8] 汤井源, 韩鹏, 左文仁, 等. 熊果酸对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(8): 1421-1424.
- [9] 王金艳, 孟祥茹, 肖亚利, 等. 熊果酸对动脉粥样硬化大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(5): 815-818.
- [10] 丁秦超, 冯璐燕, 应娜, 等. 熊果酸通过AMPK介导的信号通路激活自噬改善油酸诱导的肝细胞脂肪沉积[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(10): 1150-1155.
- [11] 朱兆伟, 相芬芬, 范嫣, 等. 熊果酸抑制肿瘤生长机制研究进展[J]. 陕西中医, 2020, 41(7): 999-1002.
- [12] 阮勇, 莫伟明, 陈健, 等. 不同剂量熊果酸对糖尿病大鼠肾功能及血脂血糖水平的影响[J]. 中医学报, 2019, 34(5): 1007-1011.

- [13] 李爱群, 王绮雯. 熊果酸对过氧化氢诱导大鼠心肌细胞氧化损伤的保护作用[J]. 血栓与止血学, 2017, 23(6): 908-914.
- [14] 郑君毅, 郭绪昆. 氧化应激与自噬在心脏疾病中的相互作用与分子机制[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(8): 885-886.
- [15] 崔健昆, 耿乃志, 孟凡吉, 等. 去甲氧基姜黄素通过PI3K-Akt-mTOR信号通路调控细胞自噬对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用研究[J]. 中医药学报, 2020, 48(8): 19-24.
- [16] 樊荣, 李龙, 乔中原, 等. 白杨素对心肌缺血再灌注损伤大鼠 Nrf2/HO-1 信号通路的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(8): 815-824.
- [17] TAHHAN A S, SANDESARA P B, HAYEK S S, et al. Association between oxidative stress and atrial fibrillation[J]. Heart Rhythm, 2017, 14(12): 1849-1855.
- [18] KATTOOR A J, POTHINENI N, PALAGIRI D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis[J]. Current Atherosclerosis Reports, 2017, 19(11): 42-49.
- [19] 余婧萍, 宋祯彦, 李富周, 等. 芍药苷通过促进细胞自噬抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SH-SY5Y 细胞的氧化损伤[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(6): 653-659.
- [20] TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde(MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges[J]. Anal Biochem, 2017, 524: 13-30.
- [21] ZHOU Q, ZHU L, ZHANG D, et al. Oxidative stress-related biomarkers in postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analyses[J]. Disease Markers, 2016, 2016: e7067984.
- [22] ONORATI AV, DYEZYNSKI M, OJHA R, et al. Targeting autophagy in cancer[J]. Cancer, 2018, 124(16): 3307-3318.
- [23] KAUR N, RAJA R, RUIZ-VEKASCO A, et al. Cellular protein quality control in diabetic cardiomyopathy: from bench to bedside [J]. Front Cardiovasc Med, 2020, 7: e585309.
- [24] FU S, CHEN L, WU Y, et al. Gastrodin pretreatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury through promoting autophagic flux[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2421-2428.
- [25] ZHONG Y, ZHONG P, HE S, et al. Trimetazidine protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by promoting AMP-activated protein kinase-dependent autophagic flux[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2017, 69(6): 389-397.
- [26] LING Y, CHEN G, YI D, et al. Polydatin post-treatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by promoting autophagic flux [J]. Clinical Science, 2016, 130(18): 1641-1653.
- [27] ZENG C, LI H, FAN Z, et al. Crocin-elicited autophagy rescues myocardial ischemia/reperfusion injury *via* paradoxical mechanisms [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(3): 515-530.
- [28] YANG J J, ZHANG X H, MA X H, et al. Astragaloside IV enhances GATA-4 mediated myocardial protection effect in hypoxia/reoxygenation injured H9c2 cells[J]. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2020, 30(5): 829-842.
- [29] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. Essays Biochem, 2017, 61(6): 609-624.
- [30] KLIONSKY D J, ABDALLS F C, ABEKUIVUCH H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 445-544.
- [31] JIANG Q, HAO R, WANG W, et al. SIRT1/Atg5/autophagy are involved in the antiatherosclerosis effects of ursolic acid[J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2016, 420(1-2): 171-184.

(编辑: 邹元平)